

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類</b> C07K 7/06, C12N 5/08, 15/12, A61K 38/08, 45/05	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO99/29715</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1999年6月17日 (17.06.99)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP98/05430  <b>(22) 国際出願日</b> 1998年12月2日 (02.12.98)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平9/335745 1997年12月5日 (05.12.97) JP  <b>(71) 出願人 ; および</b> <b>(72) 発明者</b> 伊東恭悟 (ITO, Kyogo) [JP/JP] 〒841-0205 佐賀県三養基郡基山町けやき台2-25-9 Saga, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 七條茂樹 (SHICHIGO, Shigeki) [JP/JP] 〒830-0003 福岡県久留米市東櫛原町47-3-608 Fukuoka, (JP) 今井康久 (IMAI, Yasuhisa) [JP/JP] 〒830-0006 福岡県久留米市南蕨西町2000-1-105 Fukuoka, (JP)		<b>(74) 代理人</b> 弁理士 青山 蓑, 外 (AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(54) Title: TUMOR ANTIGEN PEPTIDE DERIVATIVES</b>  <b>(54) 発明の名称</b> 腫瘍抗原ペプチド誘導体  <b>(57) Abstract</b> Tumor antigen peptide derivatives containing the whole amino acid sequence derived from the amino acid sequence Glu Tyr Arg Gly Phe Thr Gln Asp Phe (SEQ ID NO:3) by altering one to several amino acid residues or a part thereof and capable of binding to HLA-A24 antigen and thus being recognized by cytotoxic T cells; the use of these tumor antigen peptide derivatives in treating, preventing and diagnosing tumors; and remedies or preventives for tumors containing these peptide derivatives as the active ingredient.		

(57)要約

アミノ酸配列 Glu Tyr Arg Gly Phe Thr Gln Asp Phe (配列番号 : 3) の 1 ～ 数個のアミノ酸残基を改変したアミノ酸配列の全部又は一部を含み、かつ H L A - A 2 4 抗原と結合して細胞傷害性 T 細胞により認識され得る、腫瘍抗原ペプチド誘導体、該腫瘍抗原ペプチド誘導体の、腫瘍の治療及び予防、及び診断における使用、並びにそれを有効成分として含有する腫瘍の治療剤又は予防剤。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	CM	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UZ	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	VN	ヴェトナム
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	YU	ユーゴスラビア
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	ZA	南アフリカ共和国
CJ	コートジボワール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		

## 明 細 書

## 腫瘍抗原ペプチド誘導体

## 5 技術分野

本発明は、新規な腫瘍抗原ペプチド誘導体に関する。

## 背景技術

10 生体による腫瘍の排除には免疫系、特にT細胞が重要な役割を果たしていることが知られている。実際、ヒトの腫瘍局所には腫瘍細胞に対して傷害活性を示すリンパ球の浸潤が認められ(Arch. Surg., 126:200-205, 1990)、メラノーマからは自己の腫瘍細胞を認識する細胞傷害性T細胞(CTL)が比較的容易に分離されている(Immunol. Today, 8:385, 1987, J. Immunol., 138:989, 1987, Int. J. Cancer, 52:52-59, 1992等)。また、T細胞移入によるメラノーマ治療の  
15 臨床結果も腫瘍排除におけるT細胞の重要性を示唆している(J. Natl. Cancer. Inst., 86:1159, 1994)。

CTLが自己の腫瘍細胞を攻撃する際の標的分子については長い間不明であったが、最近の免疫学及び分子生物学の進歩により次第に明らかになってきた。すなわちCTLは、T細胞受容体(TCR)を用いて、腫瘍抗原ペプチドと呼ばれ  
20 るペプチドと主要組織適合遺伝子複合体クラスI抗原(MHCクラスI抗原、ヒトの場合はHLA抗原と呼ばれる)との複合体を認識することにより、自己の腫瘍細胞を攻撃していることが明らかとなった。

この腫瘍抗原ペプチドは、腫瘍に特有のタンパク質、すなわち腫瘍抗原タンパク質が細胞内で合成された後、プロテオソームによって細胞質内でペプチドに分解  
25 されることによって生成される。一方、小胞体で形成されたMHCクラスI抗原(HLA抗原)は、上記の腫瘍抗原ペプチドと結合し、シスゴルジを経て成熟側のトランスゴルジへと移動し、細胞表面に運ばれて抗原提示される。この抗原提示された複合体を腫瘍特異的なCTLが認識し、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗腫瘍効果を示す(臨床免疫, 27(9):1034-1042, 1995)。この

ような一連の作用の解明に伴い、腫瘍抗原タンパク質又は腫瘍抗原ペプチドをいわゆる癌ワクチンとして利用することにより、腫瘍患者の体内の腫瘍特異的なCTLを増強させ、腫瘍を治療することが可能となった。

この腫瘍抗原タンパク質としては、1991年に T. Boon らが初めてMAGEと名付けたタンパク質をヒトメラノーマ細胞から同定し (Science, 254:1643-1647, 1991)、またその後、いくつかの腫瘍抗原タンパク質がさらにメラノーマ細胞から同定されている。

今までに同定された腫瘍抗原タンパク質は、T. Boonらの総説 (J. Exp. Med., 183, 725~729, 1996)に記述されているように、以下の4つのカテゴリーに分けることができる。

1つ目のカテゴリーに含まれる腫瘍抗原タンパク質は、正常組織では精巣でのみ発現しており、腫瘍組織ではメラノーマ、頭頸部癌、非小細胞性肺癌、膀胱癌などに発現が認められる一群のタンパク質である。このカテゴリーの腫瘍抗原タンパク質としては、上記のMAGE、その12種類以上の類似するファミリーを形成するタンパク質群 (J. Exp. Med., 178:489-495, 1993)、BAGE (Immunity, 2:167-175, 1995)及びGAGE (J. Exp. Med., 182:689-698, 1995)があり、いずれもメラノーマ細胞から同定されている。

しかし、このカテゴリーの腫瘍抗原タンパク質は、メラノーマでは高発現しているものもあるが、その他の種類の腫瘍ではその腫瘍の患者のうち10%から30%程度にしか発現しておらず、種々の腫瘍の治療や診断に広く応用することはできない。

2番目のカテゴリーに含まれる腫瘍抗原タンパク質は、正常組織ではメラノサイト、網膜でのみ発現しており、腫瘍組織ではメラノーマのみで発現が認められる一群のタンパク質である。これらの組織特異的なタンパク質は腫瘍細胞のメラノーマに強度に発現していることから、メラノーマに特異的な腫瘍抗原タンパク質として機能している。このカテゴリーの腫瘍抗原タンパク質としては、チロシナーゼ (J. Exp. Med., 178:489-495, 1993)、MART-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 3515, 1994)、gp100 (J. Exp. Med., 179:1005-1009, 1994)、gp75 (J. Exp. Med., 181:799-804, 1995)があり、これらの遺伝子はいずれもメラ

ノーマ細胞からクローニングされている。また、別途Melan-A (J. Exp. Med., 180:35, 1994)が同定されたが、MART-1と同一の分子であった。

しかし、このカテゴリーの腫瘍抗原タンパク質は、メラノーマ以外の腫瘍では発現していないため、広く腫瘍の治療や診断に応用することはできない。

5        3番目のカテゴリーに含まれる腫瘍抗原タンパク質は、腫瘍特異的な突然変異の結果、CTLに認識される腫瘍抗原ペプチドとして発現されるようになった一群のタンパク質である。このカテゴリーの腫瘍抗原タンパク質としては、突然変異したCDK4 (Science, 269:1281-1284, 1995)、 $\beta$ -catenin (J. Exp. Med., 183:1185-1192, 1996)、MUM-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7976-7980, 10        1995)がある。CDK4、 $\beta$ -cateninでは、1つのアミノ酸変異により、ペプチドのMHCクラスI抗原結合親和性が増加し、T細胞に認識されるようになる。MUM-1では、突然変異により、通常は翻訳されないイントロン部位が翻訳されることにより生じるペプチドがT細胞に認識される。しかし、これらの突然変異の頻度は低いため、広く腫瘍の治療や診断に応用することはできない。

15        4番目のカテゴリーに含まれる腫瘍抗原タンパク質は、正常組織にも広範に発現しているが、CTLに認識されるタンパク質であり、P15 (J. Immunol., 154:5944-5955, 1995)がメラノーマ細胞から同定されている。

これまでに知られている腫瘍抗原タンパク質又は腫瘍抗原ペプチドの同定は以下の様にしてなされている。

20        まず、腫瘍細胞及びこの細胞を攻撃するCTL (通常、腫瘍細胞と同一の患者のリンパ球から樹立する)からなるセットを用意する。つづいて、このセットの細胞を用いて腫瘍抗原ペプチドを直接同定するか、又は腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子を決定し、対応する腫瘍抗原ペプチドを同定する。

25        腫瘍抗原ペプチドを直接同定する方法では、腫瘍細胞のMHCクラスI抗原に結合している腫瘍抗原ペプチドを酸性条件下で抽出し、高速液体クロマトグラフィーで分離された種々のペプチドを、MHCクラスI抗原を発現しているが腫瘍抗原タンパク質を発現していない細胞 (例えば、同一患者のB細胞など)にパルスし、CTLの反応を調べることにより、腫瘍抗原ペプチドを同定し、さらにマスペクトロメトリーなどを用いて配列を決定する。この方法によって、メラノ

ーマ細胞から g p 1 0 0 と同一分子のPme117由来の腫瘍抗原ペプチドが同定された(Science, 264:716-719, 1994)。

腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子を決定してさらにその対応する腫瘍抗原ペプチドを同定する方法としては、分子生物学的手法を用いて腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子をクローニングする方法がある。腫瘍細胞から c DNA  
5 を調製し、その c DNA を腫瘍抗原タンパク質を発現していない細胞 (例えば COS 細胞など) に MHC クラス I 抗原遺伝子とともにトランスフェクトして一過的に発現させ、それに対する CTL の反応性に基づくスクリーニングを繰り返す  
行い、腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子を単離する。この方法により、上  
10 記の MAGE、チロシナーゼ、MART-1、g p 1 0 0、g p 7 5 の遺伝子がクローニングされた。

得られた腫瘍抗原遺伝子の情報から実際に MHC クラス I 抗原 (HLA 抗原) に結合して提示されている腫瘍抗原ペプチドを推定、同定するためには次のような方法を用いる。まず、PCR、エキソヌクレアーゼ、制限酵素などにより様々  
15 なサイズの腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子のフラグメントを作製し、MHC クラス I 抗原遺伝子とともに腫瘍抗原タンパク質を発現していない細胞 (例えば COS 細胞など) にトランスフェクトして一過性に発現させ、CTL の反応性に基づいて腫瘍抗原ペプチドを含む領域を限定する。次いで、限定した領域に  
基づく種々のペプチドを合成し、MHC クラス I 抗原は発現しているが、腫瘍抗原タンパク質を発現していない細胞にパルスし、CTL の反応を調べるなどの方法  
20 で腫瘍抗原ペプチドを同定する (J. Exp. Med., 176:1453, 1992, J. Exp. Med., 179:24, 759, 1994)。また、HLA-A1, -A201, -A205, -A11, -A24, -A31, -A6801, -B7, -B8, -B2705, -B37, -Cw0401, -Cw0602 などの MHC の型については、結合して提示されるペプチドの配列の規則性 (モチーフ) が判明しており  
25 (Immunogenetics, 41:178-228, 1995)、それを参考にして腫瘍抗原ペプチドの候補を調べ、そのペプチドを合成して上記と同様な方法で確認する方法も用いられる (Eur. J. Immunol., 24:759, 1994, J. Exp. Med., 180:347, 1994)。

以上のような方法を用いて種々の腫瘍抗原タンパク質及び腫瘍抗原ペプチドの同定が行われてきた。しかし、上記のように既知の腫瘍抗原タンパク質はいずれ

も、限られた腫瘍でしか発現していないか、又は多くの種類の腫瘍で発現しているてもその腫瘍の患者のうちの少数にしか発現していないため、種々の腫瘍の治療や診断に幅広く応用できるものではない。

## 5 発明の開示

本発明は、腫瘍の種類や対象による制限がなく、広く一般的に利用可能な腫瘍抗原ペプチドの誘導体を得ること、特に発生頻度の高い扁平上皮癌等の治療や診断に幅広く応用可能な腫瘍抗原タンパク質及びその対応する腫瘍抗原ペプチド及びその誘導体を得ることを目的とする。すなわち本発明は、メラノーマ以外の腫瘍、さらに詳しくは、扁平上皮癌由来の新規な腫瘍抗原ペプチド誘導体、又は該腫瘍抗原ペプチド誘導体を用いて腫瘍を治療、予防又は診断するための方法、組成物、キット等を提供することを目的とする。本発明は、広範なヒト対象が保有しているHLA抗原であるHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチド誘導体を提供することを目的とする。

上記の目的を達成するために、本発明者らは食道癌由来の扁平上皮癌細胞株KE-4(以下、食道癌細胞株KE-4、あるいは単にKE-4と称す)を樹立し、また該KE-4において発現するHLA抗原であるHLA-A2601、HLA-A2402等に拘束性の腫瘍抗原ペプチドを認識するCTL(以下、KE-4CTLと称す)をも樹立した(Cancer. Res., 55:4248-4253, 1995)。

つづいて、線維芽細胞株VA-13細胞に、KE-4から作製したcDNAライブラリーの組換えプラスミドとHLA-A2601cDNAの組換えプラスミドを同時にトランスフェクトし、そのトランスフェクタントにKE-4CTLを作用させ、KE-4CTLが活性化されたか否かをIFN- $\gamma$ の産生量で測定することにより、新規な腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングした。その結果、メラノーマ以外の腫瘍細胞から、初めて、新規な腫瘍抗原タンパク質をコードする新規な遺伝子をクローニングすることに成功した。クローニングされた遺伝子のヌクレオチド配列を配列番号：2に、推定のアミノ酸配列を配列番号：1に示す。

本発明者らは、次に、上記の腫瘍抗原タンパク質のアミノ酸配列中、実際に腫瘍抗原ペプチドとして機能する部分の同定を試み、HLA-A26、HLA-A24等に拘束性

の種々の腫瘍抗原ペプチド部分を同定した。

このうちHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドとして、配列番号：1に記載のアミノ酸配列における第690位～第698位のアミノ酸配列を有するペプチド（配列番号：3）を同定した。次いで、本発明者らは、配列番号：3に記載のHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸残基を改変して種々のペプチド誘導体を作製し、活性の有無を測定したところ、それらの誘導体も腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有することが明らかとなった。

本発明は、以上のような知見に基づき完成したものである。

即ち本発明の要旨は、配列番号：3に記載のアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸残基を改変したアミノ酸配列の全部又は一部を含み、かつHLA-A24抗原と結合して細胞傷害性T細胞により認識され得る、腫瘍抗原ペプチド誘導体を提供するものである。

#### 図面の簡単な説明

図1は、食道癌細胞株KE-4からクローニングした腫瘍抗原タンパク質をコードする組換えプラスミド6DIの挿入配列部分をDNAプローブとして用い、ノーザンブロットハイブリダイゼーションにより種々の細胞株(a)及び種々の組織(b)（心臓(heart)、脳(brain)、胎盤(placenta)、肺臓(lung)、肝臓(liver)、骨格筋(skeletal muscle)、腎臓(kidney)、すい臓(pancreas)、脾臓(spleen)、胸腺(thymus)、前立腺(prostate)、精巣(testis)、子宮(uterus)、小腸(small intestine)、結腸(粘膜内層)(colon (mucosal lining))、及び末梢血白血球(peripheral blood leukocyte)での腫瘍抗原タンパク質mRNAの発現分布を調べた結果を示す電気泳動の写真である。

図1a)中、KE-4、KE-3、TE-8及びTE-9は食道癌細胞株を、Kuma-1は頭頸部癌細胞株を、HSC-4は口腔癌細胞株を、Bec-1はB細胞株を、KMG-Aは胆嚢癌細胞株を、R-27は乳癌細胞株を、KIM-1、KYN-1及びHAK-3は肝癌細胞株を、そしてM36及びM37はメラノーマ細胞株を、それぞれ表す。図1から、クローン6DIにコードされている腫瘍抗原タンパク質のmRNAが各種癌細胞及び正常組織で広範に発現していることが分かる。



図2は、配列番号：5、配列番号：6及び配列番号：7に記載のアミノ酸配列よりなるペプチドのインビトロでのIFN- $\gamma$ 産生誘導活性を示したグラフである。すなわち、上記ペプチド誘導体でHLA-A24陽性の健常人末梢血リンパ球を刺激し、腫瘍抗原を発現しているHLA-A24陽性のKE-4細胞の存在下で、その刺激されたリンパ球から産生されるIFN- $\gamma$ 量を測定した。図2から、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7の各ペプチド誘導体によってCTLが誘導されることが分かる。

#### 発明を実施するための最良の形態

本明細書中、本発明の「腫瘍抗原ペプチド誘導体」とは、配列番号：3に記載のアミノ酸配列の1又はそれ以上、好ましくは1～数個のアミノ酸残基を改変したアミノ酸配列の全部又は一部を含み、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得るという腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するものを指す。ここで、配列番号：3に記載のアミノ酸配列よりなるペプチドは、HLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドであり、配列番号：1に記載の腫瘍抗原タンパク質のアミノ酸配列の第690位～第698位に位置する腫瘍抗原ペプチドである。

従って、配列番号：3に記載の腫瘍抗原ペプチドのアミノ酸配列の1又はそれ以上のアミノ酸残基を改変した誘導体の全部又は一部を含み、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得るという腫瘍抗原ペプチドとしての活性を有するものは、全て、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の範疇に含まれる。

本発明において「HLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得る」とは、腫瘍抗原ペプチド誘導体がHLA-A24抗原と結合して複合体を形成し、かかる複合体をCTLが認識できることをいう。

本発明においてアミノ酸残基の「改変」とは、アミノ酸残基の置換、欠失及び／又は付加を意味し、好ましくはアミノ酸残基の置換が挙げられる。以下、主としてアミノ酸残基の置換に関して具体的に説明するが、その説明はアミノ酸残基の欠失又は付加にも適用しうるものである。

本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体は、例えば、配列番号：3に記載のアミノ酸配列の1以上、好ましくは1～数個のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換さ

れたアミノ酸配列の全部又は一部を含む候補ペプチドを合成し、該候補ペプチドとHLA-A24抗原との複合体がCTLにより認識されるか否かをアッセイすることにより、同定することができる。

- 5 置換されるアミノ酸残基の数及び位置は、腫瘍抗原ペプチドとしての活性が維持される限り、任意であるが、配列番号：3のペプチド断片が9アミノ酸残基であることから、1個から数個の範囲が好ましい。

#### ペプチドの合成

- 10 ペプチドの合成は、通常のペプチド化学において用いられる方法に準じて行うことができる。該公知方法としては、文献（ペプタイド・シンセシス（Peptide Synthesis），Interscience, New York, 1966；ザ・プロテインズ（The Proteins），Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976；ペプチド合成，丸善（株），1975；ペプチド合成の基礎と実験，丸善（株），1985；医薬品の開発続第14巻・ペプチド合成，広川書店，1991）などに記載されている方法が挙げられる。

#### 15 HLA抗原－拘束性のCTLによる認識

合成した候補ペプチドがHLA-A24抗原に結合してCTLにより認識されるか否かは、例えば以下の方法で調べることができる。

- 20 （1）J. Immunol., 154, p2257, 1995に記載の方法に従い、HLA-A24抗原陽性のヒトから末梢血リンパ球を単離し、イン・ビトロで候補ペプチドを添加して刺激した場合に、該候補ペプチドをパルスしたHLA-A24陽性細胞を特異的に認識するCTLが誘導されるか否かを調べる。ここで、CTL誘導の有無は、例えば、抗原ペプチド提示細胞に反応してCTLが産生する種々のサイトカイン（例えばIFN- $\gamma$ ）の量を酵素免疫測定法（ELISA）等により測定することによって調べることができる。又は、 $^{51}\text{Cr}$ で標識した抗原ペプチド提示細胞に対するCTLの傷害性を測定する方法（ $^{51}\text{Cr}$ リリースアッセイ、Int. J. Cancer, 58:p317, 1994）によっても調べることができる。前記アッセイで用いるHLA-A24陽性細胞としては、食道癌細胞株KE-4（FERM BP-5955）又はSKG-IIIa細胞（JCRB 0232）などの一般に入手可能な細胞が挙げられる。

25 （2）さらに、HLA-A24 cDNA発現プラスミドをCOS-7細胞（ATCC No. CRL1651）や

VA-13細胞（理化学研究所細胞銀行）に導入し、得られた細胞に対して前記候補ペプチドをパルスし、HLA-A24拘束性のCTL株であるKE-4CTL（受託番号：FERM BP-5954）を反応させ、KE-4CTLが産生する種々のサイトカイン（例えばIFN- $\gamma$ ）の量を測定することによっても、調べることができる（J. Exp. Med., 187:277, 1998）。

以上のような種々のアッセイ法の実例は、後述の参考例の7、8及び実施例2に記載されている。

なお、腫瘍抗原ペプチド誘導体のHLA-A24抗原に対する結合親和性は、該誘導体とラジオアイソトープで標識された標準ペプチド（配列番号：3）とのHLA抗原への結合の競合阻害アッセイにより、無細胞系で容易に測定することができる（R. T. Kuboら、J. Immunol., 152:3913, 1994）。

本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の長さは、HLA-A24抗原と結合してCTLに認識されることを条件として特に限定されない。本発明の目的から、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体は、それ自身がペプチド断片としてHLA-A24抗原と結合して抗原提示細胞表面に提示されるのみならず、適宜、標的細胞内で断片化され、配列番号：3に記載のアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列の全部又は一部を含み、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識されうる適当な長さのペプチド断片を与えることができるペプチド誘導体をも包含する。

それ自身がHLA-A24抗原と結合して提示されるペプチド断片としては、8～11アミノ酸程度が好ましい。即ち、アミノ酸残基の置換に係るペプチド誘導体の場合は、例えば、1)配列番号：3に記載のアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列よりなる9アミノ酸のペプチド；又は、2)前記1)のペプチド全体を含む10～11アミノ酸程度の長さのペプチド、又は前記1)のペプチドの一部よりなる8アミノ酸程度のペプチドであって、HLA-A24抗原と結合してCTLにより認識されるという腫瘍抗原ペプチド活性を有する誘導体が挙げられる。

本明細書の記載に従って、配列番号：3のアミノ酸配列の任意の位置でアミノ酸が改変されたペプチドを合成し、腫瘍抗原ペプチドとしての活性に基づいて目的の腫瘍抗原ペプチド誘導体をスクリーニングし、得ることができる。

ところで、HLA抗原に結合して提示される抗原ペプチドの配列には規則性（モチーフ）があり、HLA-A24抗原の場合、8～11アミノ酸よりなるペプチドのうちのN末端から2番目のアミノ酸がフェニルアラニン、チロシン、メチオニン又はトリプトファンであり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン又はメチオニンであることが知られている（Immunogenetics, 41:178, 1995、J. Immunol., 152:p3913, 1994、J. Immunol., 155:4307, 1994）。また、このようなモチーフ上とり得るアミノ酸を類似の性質を持つアミノ酸で置換して得られる誘導体もHLA-A24抗原結合性ペプチドとして許容される可能性がある。

従って、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の例として、配列番号：3に記載のアミノ酸配列のうち、第2位及び／又は第9位（C末端）のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換したアミノ酸配列の全部又は一部を含み、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識されるという活性を持つペプチド誘導体が挙げられる。

従って、本発明は、1つの実施態様として配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第2位及び／又は第9位のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部又は一部を含み、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチド誘導体を提供する。

好ましいペプチド誘導体では、配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第2位及び／又は第9位のアミノ酸残基が前記モチーフ上知られたアミノ酸残基で置換されている。すなわち配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第2位のチロシンをフェニルアラニン、メチオニン又はトリプトファンに置換し、及び／又は第9位のフェニルアラニンをロイシン、イソロイシン、トリプトファン又はメチオニンに置換しているアミノ酸配列（配列番号：4）の全部又は一部を含み、かつ前記活性を有する腫瘍抗原ペプチド誘導体が好ましい。

従って、他の実施態様では、本発明は配列番号：4に記載のアミノ酸配列の全部又は一部を含み、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチド誘導体を提供する。

さらに、前記モチーフに基づきアミノ酸残基の置換を行った腫瘍抗原ペプチド誘導体の好適な例としては、配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第9位のフェ

5 ニルアラニンがトリプトファン、ロイシン、又はイソロイシンに置換されたアミノ酸配列の全部又は一部を含む腫瘍抗原ペプチド誘導体、配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第2位のチロシンがフェニルアラニンに置換されたアミノ酸配列の全部又は一部を含む腫瘍抗原ペプチド誘導体、あるいはこれらの置換の組み合わせに係る腫瘍抗原ペプチド誘導体が挙げられる。

従って、本発明は、好ましい実施態様として、配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第9位のフェニルアラニンがトリプトファン、ロイシン、又はイソロイシンに置換されたアミノ酸配列の全部又は一部を含み、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチド誘導体を提供する。

10 本発明はまた、他の好ましい実施態様として、配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第2位のチロシンがフェニルアラニンに置換されたアミノ酸配列の全部又は一部を含み、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチド誘導体を提供する。

15 本発明は、さらに他の好ましい実施態様として、配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第9位のフェニルアラニンがトリプトファン、ロイシン、又はイソロイシンに置換されており、かつ第2位のチロシンがフェニルアラニンに置換されているアミノ酸配列の全部又は一部を含み、かつHLA-A24抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチド誘導体をも提供する。

20 特に好ましい腫瘍抗原ペプチド誘導体は、配列番号：5に記載のアミノ酸配列の全部又は一部を含んでいる。

25 本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体は広範なヒト対象が保有している（例えば、日本人の約60%が保有している）HLA抗原であるHLA-A24に結合して提示される腫瘍抗原ペプチド誘導体である。従って、多くの腫瘍患者に一般的に適用可能であり、しかも、発生頻度の高い扁平上皮癌等に幅広く応用可能なものであるため、新規な抗腫瘍剤としての有用性が期待される。ちなみに扁平上皮癌はヒトの癌で最も多く認められる癌の一つであり、特に食道癌や肺癌での扁平上皮癌は現在の化学療法や放射線療法に比較的抵抗性を示すことが知られている。

以下に詳しく述べるように、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体はインビボ及びインビトロで腫瘍の治療、予防、診断など様々な目的に有用である。

従って、本発明はまた、本発明の前記腫瘍抗原ペプチド誘導体の少なくとも1種を有効成分として含有する腫瘍の治療剤又は予防剤を提供するものである。

腫瘍の治療又は予防を目的とする使用に際しては、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の少なくとも1種又は2種以上を組み合わせ、要すれば他の腫瘍抗原ペプチド等と組み合わせて患者に投与する。本発明の腫瘍の治療剤又は予防剤をHLA-A24陽性であり、かつ本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体が由来する腫瘍抗原タンパク質に関して陽性の患者に投与すると、抗原提示細胞のHLA-A24抗原に腫瘍抗原ペプチド誘導体が高密度に提示され、提示されたHLA-A24抗原複合体特異的CTLが増殖して腫瘍細胞を破壊する。その結果、患者の腫瘍を治療し、又は腫瘍の増殖又は転移を予防することができる。既述のごとく、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体が由来する腫瘍抗原タンパク質は、食道癌、肺癌等の扁平上皮癌等に広範に発現しているので、本発明の腫瘍の治療剤又は予防剤は、適用範囲が広いという利点を有する。さらに、前記扁平上皮癌は、化学療法や放射線療法に抵抗性を示すことが多いが、本発明の腫瘍治療剤を併用することにより、治療効果を上げることが可能となる。また、癌発生部位を特定しなくても治療が可能であることも大きい利点である。

本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体を含有する腫瘍の治療剤又は予防剤は、細胞性免疫が効果的に成立するようにアジュバントとともに投与したり、粒子状の剤型にして投与することができる。アジュバントとしては、文献 (Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994) に記載のものなどが応用可能である。また、リポソーム製剤、直径数 $\mu\text{m}$ のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤など外因性の抗原ペプチド誘導体をHLA抗原へ効率良く抗原提示させ得る製剤なども用いられる。投与方法としては、皮内投与、皮下投与、静脈注射などが考えられる。本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の投与量は、治療すべき疾患、患者の年齢、体重等に応じて適宜調整することができるが、通常、0.0001mg~1000mg、好ましくは0.001mg~1000mg、より好ましくは0.1mg~10mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

また、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体を用いてインビトロで抗原提示細胞を誘導することができ、そのような細胞は腫瘍の治療等に有用である。

従って、本発明は、腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞の表面に、HLA-A24抗原と本発明の前記腫瘍抗原ペプチド誘導体との複合体を提示させてなる抗原提示細胞を提供する。

5 本発明はまた、前記抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤を提供する。

ここで「抗原提示能を有する細胞」とは、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体を提示可能なHLA-A24抗原を細胞表面に発現している細胞であれば特に限定されないが、特に抗原提示能が高いとされる樹状細胞が好ましい。

10 そのような抗原提示細胞を調製するには、腫瘍患者から抗原提示能を有する細胞を単離し、該細胞に本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体を体外でパルスしてHLA-A24抗原と前記ペプチド誘導体との複合体を作製する(Cancer Immunol. Immunother., 46:82, 1998)。

15 前記抗原提示細胞を有効成分として含有する腫瘍の治療剤は、抗原提示細胞を安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。上記の腫瘍治療剤を患者の体内に戻すと、HLA-A24陽性かつ本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の由来である腫瘍抗原タンパク質陽性の患者の体内で効率良く特異的なCTLが誘導され、腫瘍を治療し、さらには転移を予防することができる。

20 さらに、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体のイン・ビトロでの利用法として、以下の養子免疫療法における利用が挙げられる。

すなわち、メラノーマにおいては、患者本人の腫瘍内浸潤T細胞を体外で大量に培養して、これを患者に戻す養子免疫療法に治療効果が認められている

25 (J. Natl. Cancer. Inst., 86:1159、1994)。またマウスのメラノーマにおいては、脾細胞をイン・ビトロで腫瘍抗原ペプチドTRP-2で刺激し、腫瘍抗原ペプチドに特異的なCTLを増殖させ、該CTLをメラノーマ移植マウスに投与することにより、転移抑制が認められている(J. Exp. Med., 185:453, 1997)。これは、抗原提示細胞のHLA抗原と腫瘍抗原ペプチドとの複合体を特異的に認識するCTLをイン・ビトロで増殖させた結果に基づくものである。本発明の腫瘍抗原ペ

プチド誘導体を用いて、イン・ビトロで患者末梢血リンパ球を刺激して腫瘍特異的CTLを増やした後、このCTLを患者に戻すことからなる腫瘍の治療法は有用であると考えられる。

5 従って、本発明はまた、HLA-A24抗原と本発明の前記腫瘍抗原ペプチド誘導体との複合体を特異的に認識する細胞傷害性T細胞をも提供するものである。

さらに本発明は、前記細胞傷害性T細胞を有効成分として含有する腫瘍の治療剤を提供するものである。

10 該治療剤は、CTLを安定に維持するために、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、培地等を含むことが好ましい。投与方法としては、静脈内投与、皮下投与、皮内投与が挙げられる。上記の治療剤を患者の体内に戻すことにより、HLA-A24陽性かつ本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体の由来である腫瘍抗原タンパク質陽性の患者の体内でCTLによる腫瘍細胞の傷害作用が促進され、腫瘍細胞を破壊することにより、腫瘍を治療し、さらには転移を予防することができる。

15 また、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体を腫瘍の診断に用いるには、例えば、常法に従って該腫瘍抗原ペプチド誘導体に対する抗体を調製し、要すれば適宜標識し、それを用いて腫瘍が疑われる患者から得た試料(例えば血液、腫瘍組織など)中の抗原の存在を検出することにより腫瘍の有無を診断することができる。さらに、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体そのものを診断薬に用い、前記血液又は腫瘍組織などの試料中の抗体の存在を検出することにより腫瘍の有無を診断することも可能である。

20 本発明はまた、上記の腫瘍抗原ペプチド誘導体、該腫瘍抗原ペプチド誘導体を提示している抗原提示細胞、該腫瘍抗原ペプチド誘導体とHLA-A24抗原との複合体を特異的に認識する細胞傷害性T細胞を用いて腫瘍を治療又は予防、又は診断する方法を提供する。さらに、本発明の腫瘍抗原ペプチド誘導体は、当該技術分野における研究用試薬としても有用である。

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

参考例 腫瘍抗原タンパク質cDNAのクローニング及びHLA-A2拘束性腫瘍抗原ペ



## ブチドの同定

### 1. 食道癌細胞株に対する細胞傷害性T細胞 (CTL) 株の樹立

中尾ら著, Cancer Res., 55:4248-4252 (1995) の記載に従い、組織型が扁平上皮癌に分類される食道癌細胞株KE-4に対するCTLを患者の末梢血単核球細胞から樹立し、KE-4CTLと命名して実験に使用した。食道癌細胞株KE-4及びKE-4CTLは、茨城県つくば市東1丁目1番3号、工業技術院生命工学工業技術研究所に、それぞれ受託番号FERMBP-5955及びFERMBP-5954で寄託されている(寄託日: いずれも平成9年5月23日)。また、前述の中尾らの報告に従い、KE-4のHLAクラスI分子のタイピングを行い、HLA-A2402、-A2601、-B54、-B60、-Cw1、-Cw3であることを確認した。

### 2. HLA-A2601 cDNA及びHLA-A2402 cDNAの調製

KE-4から、中尾ら著, Cancer Res., 55:4248-4252 (1995) の記載に従い、HLA-A2601 のcDNAを発現ベクターpCR3 (INVITROGEN社製) に組み込んだ組換えプラスミドを作製した。また同様な方法により、HLA-A2402についても組換えプラスミドを作製した。

### 3. KE-4由来cDNAライブラリーの作製

KE-4からmRNA精製システム (ファルマシアバイオテック社製) を用い添付のプロトコールに従い、全RNA画分の分離及び oligo(dT) カラムによる poly(A)<sup>+</sup> mRNAの調製を行った。mRNAよりスーパースクリプトプラスミドシステム (GIBCO BRL社製) を用い添付のプロトコールに従い、両端にNotIアダプターとSalIアダプターを連結したcDNAを作製した後、このcDNAを発現ベクターのプラスミドpSV-SPORT1 (GIBCO BRL 社製) の制限酵素NotI及びSalIの切断部位にライゲーションにより連結して組換えプラスミドを得た。この組換えプラスミドをジーンパルサー (Bio-Rad社製) を用いて25  $\mu$ F, 2.5k Vの条件で、電気パルスにより大腸菌のエレクトロマックス DH10B/p3<sup>TM</sup>セル (GIBCO BRL社製) に導入し、アンピシリン (50  $\mu$ g/ml) を含むLB培地 (1%バクトトリプトン、0.5%イーストエキス、0.5%NaCl、pH7.3) で組換えプラスミドが導入されている形質転換体を選択した。

### 4. 腫瘍抗原タンパク質遺伝子のスクリーニング

上記3. に示した形質転換体の約100個のプールからの組換えプラスミドDNAの回収は以下のように行った。すなわち、アンピシリン (50  $\mu$ g/ml)を含むLB培地の入った96ウェルU底マイクロプレートにウェルあたり 100個の形質転換体を加え培養後、その一部をウェル当たり0.25mlのTYGPN培地 (F. M. Ausubelら編、  
5 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc.)の入った別の96ウェルU底マイクロプレートに移して37°Cで48時間培養し、残りのLB培地のマイクロプレートは凍結保存した。TYGPN培地で培養した形質転換体の組換えプラスミドDNAは、マイクロプレートでアルカリ溶解法 (F. M. Ausubelら編、  
10 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc.)により調製した。イソプロパノール沈殿で回収した組換えプラスミドDNAは、50  $\mu$ lの20ng/ml RNaseを含む10mM Tris, 1mM EDTA, pH7.4溶液で懸濁した。

線維芽細胞株のVA-13 細胞 (理化学研究所細胞開発銀行, Ann. Med. Exp. Biol. Fenn., 44:242-254, 1966) へ、リポフェクチン法により以下のようにKE-4c DNAの組換えプラスミドとHLA-A2601c DNAの組換えプラスミドをダブルトランスフェクトした。すなわち、VA-13細胞を96ウェル平底マイクロプレートにウェルあたり7000個を加えて、100  $\mu$ lの10% FCSを含むRPMI 1640培養液で2日間培養した。リポフェクチン試薬 (GIBCO BRL社製)を用い、形質転換体約 100個分のKE-4c DNAの組換えプラスミド25  $\mu$ lと参考例の2. に示したHLA-A2601c DNAの組換えプラスミド10  $\mu$ l (200ng)と約35倍に希釈したリポフェクチン試薬  
15 35  $\mu$ lの混合液70  $\mu$ lの30  $\mu$ lをVA-13細胞に加えてダブルトランスフェクトした。トランスフェクタントは2点ずつ用意した。5時間後、このトランスフェクタントに200  $\mu$ lの10% FCSを含む培養液を加え、更に72時間、37°Cで培養した後、培養液を除去し、ウェルあたり10000個のKE-4CTLを加えて100  $\mu$ lの10%FCSと25U/mlのIL-2を含む培養液で37°Cで24時間培養した。培養液を回収し、KE-4CTLが産生  
20 した培養上清中のIFN- $\gamma$ 量をELISA法にて測定した。すなわち、96ウェルマイクロプレートに固着抗体として抗ヒトIFN- $\gamma$ マウスモノクローナル抗体を吸着させ、ウシ血清アルブミンで非特異的結合をブロックした後、前記培養上清中のIFN- $\gamma$ を抗体に結合させた。次に検出抗体として抗ヒトIFN- $\gamma$ ウサギポリクローナル抗体を結合させ、さらにアルカリフォスファターゼ標識した抗ウサギイムノ  
25

グロブリンヤギ抗体を結合した後、発色基質としてパラニトロフェニルフォスフェートを反応させ、1N NaOHを等量加えて反応を停止させた後、吸光度(405nm)を測定した。これをスタンダードのIFN- $\gamma$ で得られた値と比較することにより定量した。

- 5 高いIFN- $\gamma$ 産生が認められた4群については、該当する凍結保存してあったKE-4 c DNAの組み換えプラスミドによる形質転換体約100個のプールを用いてさらに以下のようにスクリーニングを行った。すなわち、形質転換体のプールをアンピシリン(50  $\mu$ g/ml)を含むLB寒天培地のプレートにまいてコロニーを得て、各群200コロニー、合計800コロニーについてウェル当たりの形質転換体が1種類
- 10 となる条件で上記と同様の方法で培養し、KE-4 c DNAの組換えプラスミドDNAを調製した。さらに上記と同様な方法でVA-13細胞へのKE-4 c DNAの組換えプラスミドとHLA-A2601 c DNAの組換えプラスミドのダブルトランスフェクトを行い、引き続いてKE-4CTLとの混合培養を行い、KE-4CTLが反応して産生した培養液中のIFN- $\gamma$ の定量を行って陽性のプラスミドを選択した。この操作により
- 15 KE-4 c DNA組換えプラスミドクローンが選択され、6DIと命名した。6DIについては、さらにもう一度、同様な操作を繰り返してKE-4CTL細胞によるIFN- $\gamma$ の産生量を上記と同じ方法により定量した。その結果を以下の表1に示す。

表1

	標的細胞	KE-4CTLが産生したIFN- $\gamma$ 量 (pg/ml)
20	VA-13細胞	0
	VA-13細胞+HLA-A2601	1.8
	VA-13細胞+6DI	4.3
	VA-13細胞+HLA-A2601 +6DI	24.0
	VA-13細胞+HLA-A0201 <sup>1)</sup>	0.9
25	VA-13細胞+HLA-A0201+6DI <sup>1)</sup>	3.0

1): 比較のため異なったタイプのHLAをトランスフェクトした場合

(トランスフェクトしたDNA量、HLA-A2601、HLA-A0201が200ng、6DIが100ngの時のデータ)

5. ノーザンハイブリダイゼーションによる腫瘍抗原タンパク質遺伝子発現の解

## 析

種々の細胞株より、RNAzol B (TEL-TEST, INC. 社製) を用いて RNA を調製した。  
5  $\mu$ g の RNA をホルムアミド、ホルムアルデヒド存在下で変性させ、アガロース電気泳動を行った後、Hybond-N+ ナイロンメンブレン (Amersham 社製) に転写、  
5 固定した。正常組織の RNA については、mRNA を固定した市販のメンブレン (CLONTECH 社製) を用いた。マルチプライム DNA ラベリングシステム (Amersham 社製) により、参考例の 4. でクローニングした組換えプラスミド 6DI の挿入配列部分を  $^{32}$ P で標識して DNA プローブを作製し、公知の方法 (中山ら著、バイオ実験イラストレイテッド②遺伝子解析の基礎、p. 148-151、秀潤社、1995年) に  
10 従って、メンブレン上の RNA にハイブリダイズさせた後、オートラジオグラフィーにより、本発明の腫瘍抗原タンパク質遺伝子の mRNA を検出した。次に、該遺伝子の mRNA の検出に用いたメンブレンを、0.5% ドデシル硫酸ナトリウム水溶液中で煮沸してプローブを剥がした後、細胞で恒常的に発現している  $\beta$ -  
15  $\alpha$ -アクチンをプローブとして、同様の方法でノーザンハイブリダイゼーションを行い、mRNA を検出して内部標準とした。結果を図 1 に示す。これらの結果より、本発明の腫瘍抗原タンパク質遺伝子の mRNA は、各種癌細胞及び正常組織で広範に発現しており、全長は、約 2.5 kb であることが明らかになった (図 1)。

20 6. 腫瘍抗原タンパク質をコードする全長の cDNA クローンのクローニングと塩基配列の決定

上記 3. に示した KE-4 由来 cDNA ライブラリーをアンピシリン (50  $\mu$ g/ml) を含む LB 寒天培地のプレートにまいてコロニーを得た後、Hybond-N+ ナイロンメンブレン (Amersham 社製) に添付のプロトコールに従って、コロニーの DNA を転写、固定した。参考例の 5. で使用したのと同じ 6DI プローブを用い、参考  
25 例の 5. と同様の条件でハイブリダイゼーションとオートラジオグラフィーを行って、腫瘍抗原タンパク質遺伝子の cDNA が組み込まれた組換えプラスミドを有する形質転換体のコロニーを選択した。さらに、選択された複数のコロニーより組換えプラスミドを回収し、制限酵素 Not I 及び Sal I で処理した後、アガロース電気泳動により組み込まれた cDNA の長さを確認した。約 2.5 kb

の c DNA が組み込まれた組換えプラスミドを選択し、これを K 3 と命名した。  
このプラスミド K 3 について DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing キット（パーキンエルマー社製）を使用して、c DNA 部分の塩基配列を決定した。決定された塩基配列を、配列表の配列番号：2 に示す。該 c DNA の全長は 2 5 2 7 塩基対であった。配列番号：2 の塩基配列によってコードされるアミノ酸配列（8 0 0 アミノ酸）を、配列番号：1 に示す。

解析の結果、配列番号：2 の塩基配列は、メラノーマ由来の既知の腫瘍抗原タンパク質の遺伝子とは相同性のない全く異なる遺伝子であった。WWW Entrez データベースを使用し、配列番号：2 に記載した塩基配列の検索を行った結果、その塩基配列の一部が、WashU-Merck EST Project により解読され、GENBANK に登録されている機能不明の 3 種類の遺伝子配列、Accession No. R89163、R62890、R00027 と 9 0 % 以上の高い相同性を示すことが明らかになった。No. R89163 は配列番号：2 の第 1893～2267 番、R62890 は第 2018～2389 番、R00027 は第 2024～2510 番に相当する。しかし、これら 3 つの配列は配列番号：2 記載の塩基配列の開始コドンより 3' 側の塩基配列であることから、アミノ酸配列を決定することができない。

なお、上記の塩基配列決定後、プラスミド K 3 を E. coli JM109 に導入し、新規な腫瘍抗原タンパク質 c DNA を含有する保存用の形質転換体である E. coli JM109 (K3) を調製した。E. coli JM109 (K3) は、茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている（寄託日：平成 9 年 5 月 2 日；寄託番号：FERM BP-5951）。

さらに、正常ヒト組織（末梢血リンパ球）の c DNA ライブラリー（GIBCO BRL 社製）を前記と同様にスクリーニングしたところ、約 2.5 kb の c DNA が組み込まれた組換えプラスミドがクローニングされ、該 c DNA の塩基配列を決定したところ、配列番号：2 の塩基配列の第 8 1 2 位（正常ヒト組織での第 8 1 2 位は“T”である）が異なる以外は同一である c DNA が単離された。これは、配列番号：2 記載の腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子を含む全長の遺伝子は、癌細胞と正常ヒト組織で、ほぼ同一の遺伝子が発現していることを示している。

次に、上記 4. と同様な方法で、新規な腫瘍抗原タンパク質遺伝子の cDNA が組み込まれた組換えプラスミド K3 と、HLA-A2601 の cDNA が組み込まれた組換えプラスミドとを VA-13 細胞にダブルトランスフェクトした細胞を標的細胞として、KE-4CTL が反応して産生した IFN- $\gamma$  量を、上記 4. の方法により定量した。その結果を以下の表 2 に示す。

表 2

標的細胞	KE-4CTL が産生した IFN- $\gamma$ 量 <sup>1)</sup> (pg/ml)
VA-13 細胞 + HLA-A2601 + K3	1 4 3 9
VA-13 細胞 + HLA-A0201 <sup>2)</sup> + K3	1 0

1) : VA-13 細胞にそれぞれの HLA をトランスフェクトした細胞に対する KE-4CTL が産生した IFN- $\gamma$  量 (バックグラウンド) を差し引いた値  
 2) : 比較のため異なったタイプの HLA をトランスフェクトした場合  
 (トランスフェクトした DNA 量 : HLA-A2601、HLA-A0201 が 200ng、K3 が 100ng の時のデータ)

以上の結果から、得られた cDNA が腫瘍抗原タンパク質をコードしていることが確認された。

#### 7. 腫瘍抗原ペプチドの同定

上記 4. でクローニングした新規な腫瘍抗原タンパク質遺伝子の部分 cDNA が組み込まれた組換えプラスミド 6DI より、Kilo-Sequence 用 Deletion Kit (宝酒造社製) を用いて、添付のプロトコールに従って、腫瘍抗原タンパク質遺伝子の cDNA が様々な長さにデリーションされたプラスミドを得た。これらのプラスミドを大腸菌のエレクトロマックス DH10B/p3<sup>TM</sup> セル (GIBCO BRL 社) に導入し、寒天培地のプレート上で培養し、無作為に 50 個のコロニーを選択した。該コロニーよりプラスミド DNA を調製し、電気泳動に付すことにより、適当な長さのプラスミドを有する 5 個のクローンを選択した。

上記 4. に記載の方法により、VA-13 細胞へ HLA-A2601 cDNA と前記プラスミド DNA をダブルトランスフェクトし、引き続いて、該トランスフェクタントと KE-4CTL とを混合培養し、4. に記載の方法に従って、培養液中の IFN- $\gamma$  を定量した。この結果、配列番号 : 2 の塩基配列の 2253 番目以降が欠失したプラスミ

ドのトランスフェクタントには、KE-4CTLからのIFN- $\gamma$ 誘導活性が認められなかった。従って、配列番号：1のアミノ酸配列の739番目の近傍以降の配列を有するペプチドにKE-4CTLからのIFN- $\gamma$ 誘導活性があると予想された。

次に、配列番号：1のアミノ酸配列の730番目以降を3アミノ酸ずつずらし  
5 て10アミノ酸残基のペプチドを21種類合成した。これらのペプチドを、HLA-A2601 cDNAをトランスフェクトしたVA-13細胞にパルスして抗原提示させたこと以外は前記と同様な方法で、培養液中のIFN- $\gamma$ を定量した。この結果、配列番号：1の第736位～745位（736～745）、第748位～757位（748～757）、第784位～793位（784～793）のアミノ酸配列  
10 を有するペプチドにIFN- $\gamma$ 誘導活性が認められた。

さらに、これら3種類のペプチドについて、より強いIFN- $\gamma$ 誘導活性を有するペプチドを同定するために、N末端又はC末端を1アミノ酸短くした9アミノ酸残基のペプチドを合成し、同様にIFN- $\gamma$ 誘導活性を測定したところ、配列番号：1の第736位～744位（736～744）、第749位～757位（749  
15 ～757）、第785位～793位（785～793）のアミノ酸配列を有するペプチドにより強いIFN- $\gamma$ 誘導活性が認められた。その結果を表3に示す。

表3

パルスした細胞	ペプチド	KE4-CTL細胞が産生したIFN- $\gamma$ 量(pg/ml)
VA-13/A2601 <sup>1</sup> )	「736～744」	203
20 VA-13/A0201 <sup>2</sup> )	「736～744」	44
VA-13/A2601	「749～757」	183
VA-13/A0201	「749～757」	89
VA-13/A2601	「785～793」	394
25 VA-13/A0201	「785～793」	102

1) VA-13細胞にHLA-A2601 cDNAをトランスフェクトした場合

2) 対照としてVA-13細胞に異なったHLA-A0201 cDNAをトランスフェクトした場合

表3より、これらのペプチドがHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドとして機能することが示された。

次いで、HLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドを以下のようにして同定した。

すなわち、HLA抗原分子に結合して提示される抗原ペプチドの配列には規則性（モチーフ）があり、HLA-A24の場合、8～11アミノ酸よりなるペプチドのうちのN末端から2番目のアミノ酸がフェニルアラニン、チロシン、メチオニン又はトリプトファンであり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン又はメチオニンであることが知られている

(Immunogenetics, 41: 178, 1995、J. Immunol., 152:p3913, 1994、J. Immunol., 155:4307, 1994)。

そこで配列番号：1に記載のアミノ酸配列より、上記モチーフに相当する第690位～698位（690～698、配列番号：3）の部分よりなるペプチドを合成した。そして、HLA-A2402 cDNAをトランスフェクトしたVA-13細胞に該ペプチドをパルスし、前記と同様な方法で、KE-4CTLからのIFN- $\gamma$ 誘導活性を調べた。結果を表4に示す。

表4

	パルスした細胞	ペプチド	KE4-CTL細胞が産生したIFN- $\gamma$ 量(pg/ml)
15	VA-13	「690～698」	157
	VA-13/A2402 <sup>1</sup> )	「690～698」	269
	VA-13/A0201 <sup>2</sup> )	「690～698」	166

1) VA-13細胞にHLA-A2402 cDNAをトランスフェクトした場合

2) 対照としてVA-13細胞に異なったHLA-A0201 cDNAをトランスフェクトした場合

表4より、「690～698（配列番号：3）」のペプチドが、腫瘍抗原ペプチドとして機能することが示された。

#### 8. 腫瘍抗原ペプチドによる末梢血リンパ球からのCTLの誘導

上記7.で示された腫瘍抗原ペプチドを用いて、KE-4の由来である癌患者の末梢血リンパ球をin vitroで刺激して抗原特異的なCTLが誘導できるか検討した。使用した腫瘍抗原ペプチドは、前記参考例の7.で得られた「736～744」、「749～757」、「690～698」の配列を有するペプチドである。前記癌患者由来の末梢血からフィコール法によりリンパ球を分離して凍結保存していた末梢血リンパ球を起眠させ、24穴のプレートに約 $2 \times 10^6$ 細胞/穴となるように移し、10% FCSとIL-2(100U/ml)を含むRPMI 1640培地で培養



した。培養液に前記腫瘍抗原ペプチドを  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  になるように加え、末梢血リンパ球を刺激した。1週間後、X線照射 ( $50\text{Gy}$ ) した約  $1 \times 10^6$  個の末梢血リンパ球とともに前記腫瘍抗原ペプチドを  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  加えて、2回目の刺激を行った。さらに1週間後、3回目の刺激を同様に繰り返した。

- 5 「736～744」、「749～757」の配列を有するペプチドについては3回目の刺激から1週間後、末梢血リンパ球を回収し、D. D. Kharkevitchら著、Int. J. Cancer, 58:317(1994)に記載の方法に従って、 $^{51}\text{Cr}$ で標識されたKE-4、及びHLA-AローカスがA2402及びA2である食道癌細胞株KE-3を標的細胞として、細胞傷害活性を測定した。結果を表5に示す。

10 表5

効果細胞	標的細胞	傷害活性 (%)
「736～744」で刺激した	KE-4	22.1
末梢血リンパ球	KE-3	3.7
「749～757」で刺激した	KE-4	35.9
15 末梢血リンパ球	KE-3	24.2

- 「736～744」の配列を有するペプチドで刺激した場合は、KE-4は強く傷害されたが、陰性対照のKE-3は傷害されなかったことから、KE-4特異的なCTLが誘導されていることが示された。また、「749～757」の配列を有するペプチドで刺激した場合は、KE-3に対する非特異的な細胞傷害活性が認められたが、20 KE-4に対してより強い細胞傷害活性が認められたことから、KE-4特異的なCTLが誘導されていることが示された。

- 「690～698 (配列番号: 3)」の配列を有するペプチドについては、3回目の刺激の後、末梢血リンパ球を回収し、10% FCS、50% AIM-V (GIBCO BRL社製)、IL-2 ( $100\text{U}/\text{ml}$ ) を含むRPMI-1640培地で培養を続けた。その後、前記と同様の方法にて、 $^{51}\text{Cr}$ で標識されたKE-4、及びVA-13細胞を標的細胞として細胞傷害活性を測定した。また、HLA-AローカスがA24のホモである健常人の末梢血からリンパ球を分離し、同様の方法にて $^{51}\text{Cr}$ で標識されたKE-4、及びHLA-AローカスがA2601のホモである肺癌細胞株のQG-56細胞を標的細胞として、細胞傷害活性を測定した。結果を表6に示す。
- 25

表 6

	効果細胞	標的細胞	傷害活性 (%)
	「690～698」で刺激した	KE-4	24.7
	癌患者末梢血リンパ球	VA-13	13.8
5	「690～698」で刺激した	KE-4	17.7
	健常人末梢血リンパ球	QG-56	11.5

癌患者末梢血リンパ球及び健常人末梢血リンパ球を「690～698（配列番号：3）」の配列を有するペプチドで刺激することにより、陰性対照であるVA13細胞、QG56細胞に対する非特異的な細胞傷害活性が認められたが、KE-4に対してより強い細胞傷害活性が認められた。以上の結果から、KE-4特異的なCTLが誘導されていることが示された。

#### 実施例1 腫瘍抗原ペプチド誘導体の合成

前記したように、HLA抗原分子に結合して提示される抗原ペプチドの配列には規則性（モチーフ）があり、HLA-A24の場合、8～11アミノ酸よりなるペプチドのうちのN末端から2番目のアミノ酸がフェニルアラニン、チロシン、メチオニン又はトリプトファンであり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン又はメチオニンであることが知られている（Immunogenetics, 41:178, 1995、J. Immunol., 152:p3913, 1994、J. Immunol., 155:4307, 1994）。前記参考例の7及び8でHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドとして同定された「690～698（配列番号：3）」に関して、前記モチーフに従いアミノ酸を置換したペプチド誘導体のアミノ酸配列を、配列番号：4に示す。

このような、配列番号：3に記載のアミノ酸配列よりなるHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチドの2番目のアミノ酸残基及び／又は9番目のアミノ酸残基を、前記規則性に基づき改変した腫瘍抗原ペプチド誘導体を、種々作成した。

その一例を以下に示す。

a) Glu-Tyr-Arg-Gly-Phe-Thr-Gln-Asp-Trp

b) Glu-Tyr-Arg-Gly-Phe-Thr-Gln-Asp-Leu

c) Glu-Tyr-Arg-Gly-Phe-Thr-Gln-Asp-Ile

d) Glu-Phe-Arg-Gly-Phe-Thr-Gln-Asp-Phe

e) Glu-Phe-Arg-Gly-Phe-Thr-Gln-Asp-Trp

5 これらペプチドはAdvanced Chemtech社のMPS 350を用い、Fmoc法により合成し、その後HPLCにより精製した (YMC-Pack ODS-A SH-363-5カラム使用)。精製純度はいずれも95%以上であった。

ペプチド誘導体の合成方法を (1) Glu-Tyr-Arg-Gly-Phe-Thr-Gln-Asp-Ile (配列番号: 5)、(2) Glu-Tyr-Arg-Gly-Phe-Thr-Gln-Asp-Leu (配列番号: 6) 及び (3) Glu-Tyr-Arg-Gly-Phe-Thr-Gln-Asp-Trp (配列番号: 7) を例として以下に詳述する。

10 (1) Glu-Tyr-Arg-Gly-Phe-Thr-Gln-Asp-Ile (配列番号: 5) の合成  
樹脂はFmoc-Ile-Alko Resin (0.62 mmol/g, 100-200 mesh) を用いた。この樹脂100mgを用いて、後記スケジュール1 (表7) に従って合成を開始し、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Gln-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OHを順次カップリングさせた。カップリングの後スケジュール1の工程3まで行い、その結果、ペプチド樹脂が得られた。

15 このペプチド樹脂にReagentK (5%フェノール、5%チオアニソール、5% H<sub>2</sub>O、2.5%エタンジチオール/TFA溶液) 2mlを加え、室温で2.5時間反応させた。氷冷下反応液にジエチルエーテル10mlを加え10分攪拌し、濾過し  
20 ジエチルエーテル10mlで洗浄した。濾上物に酢酸水10mlを加えて30分間攪拌後、樹脂を濾別し、酢酸水4mlで洗浄した。濾洗液を凍結乾燥後、得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め0.1% TFA水で平衡化させた逆相系充填剤 YMC-Pack ODS-A SH-363-5カラム (30Φ×250mm) に注入し、カラムを0.1% TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を200分で24%まで増加させ、流速  
25 7ml/min. で溶出した。溶出液をA220nmでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Glu-Tyr-Arg-Gly-Phe-Thr-Gln-Asp-Ile 47.8mgを得た。

得られたGlu-Tyr-Arg-Gly-Phe-Thr-Gln-Asp-Ileは、逆相系充填剤 YMC-PACK ODS-AM AM-303カラム (4.6Φ×250mm) を用いた、0%から60%までの0.1% TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析におい

て保持時間 19.3 分を示し、そのアミノ酸分析値及び質量分析値は理論値と一致した。

### アミノ酸分析

加水分解：1%フェノール/6N塩酸水溶液、110℃、24時間；分析法：ニンヒドリン法；\*：基準アミノ酸；（）内：理論値

5 Asx : 0.94 (1)

Thr : 0.91 (1)

Glx : 1.94 (2)

Gly : 0.99 (1)

10 \* Ile : 1.00 (1)

Tyr : 0.93 (1)

Phe : 0.98 (1)

Arg : 0.95 (1)

質量分析 (FAB) :  $[M+H]^+$  : 1128

### 15 表 7

#### スケジュール 1

工程	時間 (分) × 処理回数
1. (洗浄) DMF 1.2ml	1 × 2
2. (脱保護) 50%ピペリジン/DMF	12 × 1
20 3. (洗浄) DMF 1.2ml	1 × 7
4. (カップリング) 各アミノ基保護アミノ酸 (5当量) /NMP溶液0.9ml、DIC (5当量) /NMP 溶液0.3ml	30 × 1
5. (洗浄) DMF 1.2ml	1 × 2
25 6. (カップリング) 各アミノ基保護アミノ酸 (5当量) /NMP溶液0.9ml、DIC (5当量) /NMP 溶液0.3ml	30 × 1
7. (洗浄) DMF 1.2ml	1 × 4

(2) Glu-Tyr-Arg-Gly-Phe-Thr-Gln-Asp-Leu (配列番号：6) の合成

先の (1) と同様にして、Fmoc-Leu-Alko Resin (0.54mmol/g、100-200 mesh) 100mg を用いて、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Gln-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH を順次カップリングさせ、その後脱保護を行った。得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め 0.1% TFA 水で平衡化させた逆相系充填剤 YMC-Pack ODS-A SH-363-5 カラム (30Φ×250mm) に注入し、カラムを 0.1% TFA 水で洗浄後、アセトニトリル濃度を 200 分で 25% まで増加させ、流速 7ml/min. で溶出した。溶出液を A220nm でモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Glu-Tyr-Arg-Gly-Phe-Thr-Gln-Asp-Leu 52.5mg を得た。

得られた Glu-Tyr-Arg-Gly-Phe-Thr-Gln-Asp-Leu は、逆相系充填剤 YMC-Pack ODS-AM AM-303 カラム (4.6Φ×250mm) を用いた、0% から 60% までの 0.1% TFA を含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間 19.6 分を示し、そのアミノ酸分析値及び質量分析値は理論値と一致した。

アミノ酸分析

加水分解：1% フェノール / 6N 塩酸水溶液、110℃、24 時間；分析法：ニンヒドリン法；\*：基準アミノ酸；( ) 内：理論値

Asx : 0.97 (1)

Thr : 0.94 (1)

Glx : 1.98 (2)

Gly : 1.02 (1)

\*Leu : 1.00 (1)

Tyr : 0.94 (1)

Phe : 1.00 (1)

Arg : 0.97 (1)

質量分析 (FAB) : [M+H]<sup>+</sup> : 1128

(3) Glu-Tyr-Arg-Gly-Phe-Thr-Gln-Asp-Trp (配列番号：7) の合成

5 先の (1) と同様にして、Fmoc-Trp(Boc)-Alko Resin(0.65mmol/g、100-200mesh) 100mgを用いて、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Gln-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OHを順次カップリングさせ、その後脱保護を行った。得られた粗ペプチドを酢酸水に溶解し、予め0.1% TFA水で平衡化させた逆相系充填剤YMC-Pack ODS-A SH-363-5カラム(30Φ×250mm) に注入し、カラムを0.1% TFA水で洗浄後、アセトニトリル濃度を200分で26%まで増加させ、流速7ml/min. で溶出した。溶出液をA220nmでモニターし、目的物を含む画分を集め、凍結乾燥し、Glu-Tyr-Arg-Gly-Phe-Thr-Gln-Asp-Trp 14.0mgを得た。

10 得られたGlu-Tyr-Arg-Gly-Phe-Thr-Gln-Asp-Trpは、逆相系充填剤YMC-PACK ODS-AM AM-303カラム(4.6Φ×250mm)を用いた、0%から60%までの0.1% TFAを含むアセトニトリルの直線濃度勾配溶出法による分析において保持時間20.7分を示し、そのアミノ酸分析値 (Trpは検出できず) 及び質量分析値は理論値と一致した。

#### アミノ酸分析

加水分解：1%フェノール/6N塩酸水溶液、110℃、24時間；分析法：ニンヒドリン法；\*：基準アミノ酸；( ) 内：理論値

Asx : 0.67 (1)  
 20 Thr : 0.96 (1)  
 Glx : 2.00 (2)  
 Gly : 1.02 (1)  
 Tyr : 0.96 (1)  
 \*Phe : 1.00 (1)  
 25 Arg : 1.01 (1)

質量分析 (FAB) : [M+H]<sup>+</sup> : 1202

#### 実施例2 腫瘍抗原ペプチド誘導体の活性測定

実施例1で作成されたペプチドを用いて、参考例の7.に記載のIFN-γ誘導活性又は参考例の8.に記載のCTLの誘導能を調べることにより、これらペプチドが

腫瘍抗原ペプチドとしての機能を有していることが明らかとなる。以下、一例を示す。

前記実施例 1 にて合成した 3 種の腫瘍抗原ペプチド誘導体（配列番号：5～7）を用いて、HLA-A24陽性の健常人の末梢血リンパ球を参考例の 8. と同様な方法でin vitroでペプチド刺激してCTLが誘導できるか検討した。ペプチドによる 3 回目の刺激から 1 週間後、末梢血リンパ球を回収し、腫瘍抗原を発現している HLA-A24陽性のKE-4 細胞を標的細胞として、末梢血リンパ球が反応して産生したIFN- $\gamma$ 量を参考例の 4. の方法で測定した。また、HLA-A24陰性のVA-13細胞を標的細胞として同様に末梢血リンパ球が反応して産生したIFN- $\gamma$ 量を測定してバックグラウンド値とした。KE-4 細胞に対して産生されたIFN- $\gamma$ 量からバックグラウンドのVA-13細胞に対して産生されたIFN- $\gamma$ 量を差し引くことにより、抗原特異的CTL活性を求めた。結果を図 2 に示す。配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7の各ペプチド誘導体によってCTLが誘導されることが明らかになった。特に、配列番号：5の腫瘍抗原ペプチド誘導体は強いIFN- $\gamma$ 産生誘導活性を示した。

なお、腫瘍抗原及びHLA-A24陽性の標的細胞としてKE-4細胞の代わりに市販のSKG-IIIa細胞（J C R B 0232）を用いても、上記と同じ活性測定を行うことができる。

## 20 産業上の利用可能性

本発明により提供される新規な腫瘍抗原ペプチド誘導体は、広範な腫瘍の予防、治療又は診断に有用である。

### 配列表フリーテキスト

配列番号：4に記載のアミノ酸配列の第2番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンまたはトリプトファンであり、第9番目のアミノ酸は、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。

## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号：3に記載のアミノ酸配列の1～数個のアミノ酸残基を改変したア  
5 ミノ酸配列の全部又は一部を含み、かつHLA-A24抗原と結合して細胞傷害  
性T細胞により認識され得る、腫瘍抗原ペプチド誘導体。
2. 配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第2位及び／又は第9位のアミノ酸残  
基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列の全部又は一部を含む、請求項  
1記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。
- 10 3. 配列番号：4に記載のアミノ酸配列の全部又は一部を含む、請求項2記載の  
腫瘍抗原ペプチド誘導体。
4. 配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第9位のフェニルアラニンがトリプト  
ファン、ロイシン、又はイソロイシンに置換されているアミノ酸配列の全部又は  
一部を含む、請求項3記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。
- 15 5. 配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第2位のチロシンがフェニルアラニン  
に置換されているアミノ酸配列の全部又は一部を含む、請求項3記載の腫瘍抗原  
ペプチド誘導体。
6. 配列番号：3に記載のアミノ酸配列の第9位のフェニルアラニンがトリプト  
ファン、ロイシン、又はイソロイシンに置換されており、かつ第2位のチロシン  
20 がフェニルアラニンに置換されているアミノ酸配列の全部又は一部を含む、請求  
項3記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体。
7. 配列番号：5に記載のアミノ酸配列の全部又は一部を含む、請求項4記載の  
腫瘍抗原ペプチド誘導体。
8. 請求項1～7のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体から選択される少  
25 なくとも1種を有効成分として含有してなる、腫瘍の治療剤又は予防剤。
9. 腫瘍患者由来の単離された抗原提示能を有する細胞の表面に、HLA-A2  
4抗原と請求項1～7のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体との複合体を  
提示させてなる抗原提示細胞。
10. 請求項9記載の抗原提示細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤。

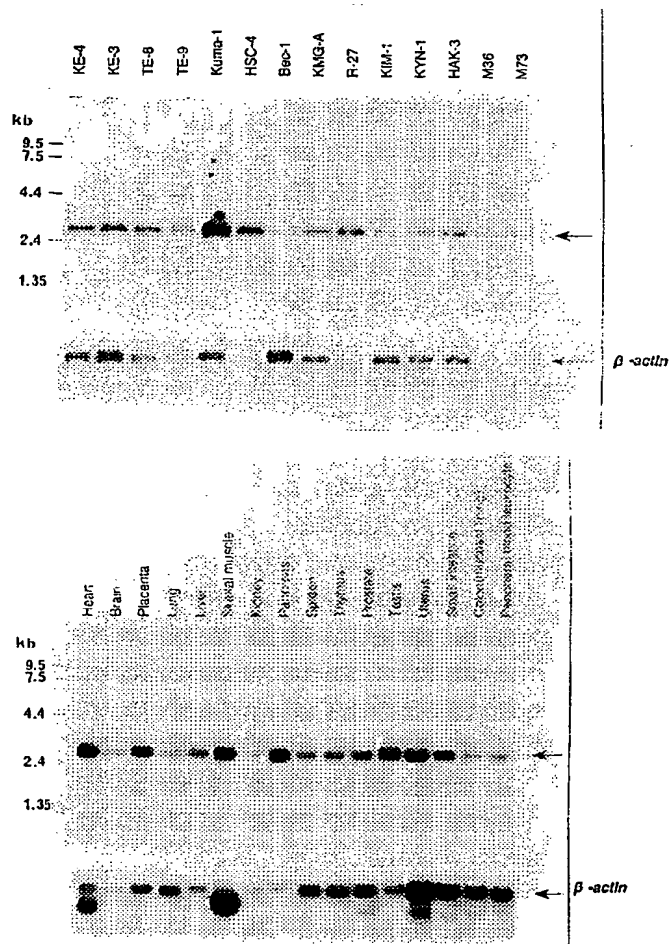


11. HLA-A24 抗原と請求項1～7のいずれかに記載の腫瘍抗原ペプチド誘導体との複合体を特異的に認識する細胞傷害性T細胞。

12. 請求項11記載の細胞傷害性T細胞を有効成分として含有してなる腫瘍の治療剤。

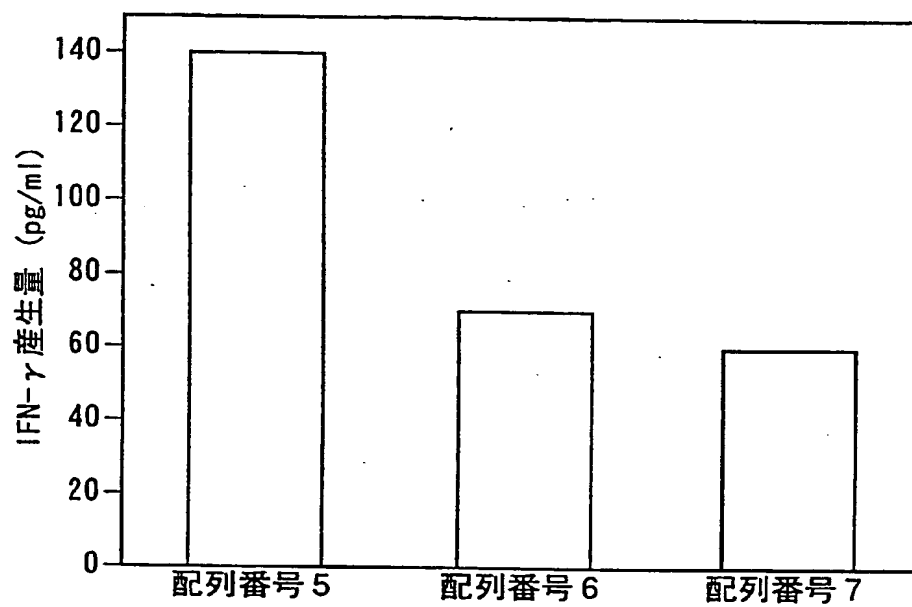
1/2

Fig. 1



2/2

Fig. 2



## SEQUENCE LISTING

<110> ITOH, Kyogo

## <120> Tumor Antigen Peptide Derivatives

5

&lt;130&gt; 661092

&lt;160&gt; 7

<210> 1

10

**<211> 800**

&lt;212&gt; PRT

<213> Homo sapiens

**<400> 1**

	Met	Gly	Ser	Ser	Lys	Lys	His	Arg	Gly	Glu	Lys	Glu	Ala	Ala	Gly	Thr	
15					5					10						15	
	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly	Ala	Thr	Glu	Gln	Pro	Pro	Arg	His	
				20					25						30		
	Arg	Glu	His	Lys	Lys	His	Lys	His	Arg	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	
			35					40						45			
20	Gly	Gly	Glu	Arg	Arg	Lys	Arg	Ser	Arg	Glu	Arg	Gly	Gly	Glu	Arg	Gly	
		50					55					60					
	Ser	Gly	Arg	Arg	Gly	Ala	Glu	Ala	Glu	Ala	Arg	Ser	Ser	Thr	His	Gly	
	65					70					75					80	
	Arg	Glu	Arg	Ser	Gln	Ala	Glu	Pro	Ser	Glu	Arg	Arg	Val	Lys	Arg	Glu	
25					85					90						95	
	Lys	Arg	Asp	Asp	Gly	Tyr	Glu	Ala	Ala	Ala	Ser	Ser	Lys	Thr	Ser	Ser	
				100					105					110			
	Gly	Asp	Ala	Ser	Ser	Leu	Ser	Ile	Glu	Glu	Thr	Asn	Lys	Leu	Arg	Ala	
				115					120					125			

2/8

Lys Leu Gly Leu Lys Pro Leu Glu Val Asn Ala Ile Lys Lys Glu Ala  
 130 135 140  
 Gly Thr Lys Glu Glu Pro Val Thr Ala Asp Val Ile Asn Pro Met Ala  
 145 150 155 160  
 5 Leu Arg Gln Arg Glu Glu Leu Arg Glu Lys Leu Ala Ala Ala Lys Glu  
 165 170 175  
 Lys Arg Leu Leu Asn Gln Lys Leu Gly Lys Ile Lys Thr Leu Gly Glu  
 180 185 190  
 Asp Asp Pro Trp Leu Asp Asp Thr Ala Ala Trp Ile Glu Arg Ser Arg  
 10 195 200 205  
 Gln Leu Gln Lys Glu Lys Asp Leu Ala Glu Lys Arg Ala Lys Leu Leu  
 210 215 220  
 Glu Glu Met Asp Gln Glu Phe Gly Val Ser Thr Leu Val Glu Glu Glu  
 225 230 235 240  
 15 Phe Gly Gln Arg Arg Gln Asp Leu Tyr Ser Ala Arg Asp Leu Gln Gly  
 245 250 255  
 Leu Thr Val Glu His Ala Ile Asp Ser Phe Arg Glu Gly Glu Thr Met  
 260 265 270  
 Ile Leu Thr Leu Lys Asp Lys Gly Val Leu Gln Glu Glu Glu Asp Val  
 20 275 280 285  
 Leu Val Asn Val Asn Leu Val Asp Lys Glu Arg Ala Glu Lys Asn Val  
 290 295 300  
 Glu Leu Arg Lys Lys Lys Pro Asp Tyr Leu Pro Tyr Ala Glu Asp Glu  
 305 310 315 320  
 25 Ser Val Asp Asp Leu Ala Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ile Leu Ser Lys  
 325 330 335  
 Tyr Asp Glu Glu Leu Glu Gly Glu Arg Pro His Ser Phe Arg Leu Glu  
 340 345 350  
 Gln Gly Gly Thr Ala Asp Gly Leu Arg Glu Arg Glu Leu Glu Glu Ile

3/8

	355	360	365
	Arg Ala Lys Leu Arg Leu Gln Ala Gln Ser Leu Ser Thr Val Gly Pro		
	370	375	380
	Arg Leu Ala Ser Glu Tyr Leu Thr Pro Glu Glu Met Val Thr Phe Lys		
5	385	390	395 400
	Lys Thr Lys Arg Arg Val Lys Lys Ile Arg Lys Lys Glu Lys Glu Val		
	405	410	415
	Val Val Arg Ala Asp Asp Leu Leu Pro Leu Gly Asp Gln Thr Gln Asp		
	420	425	430
10	Gly Asp Phe Gly Ser Arg Leu Arg Gly Arg Gly Arg Arg Val Ser		
	435	440	445
	Glu Val Glu Glu Glu Lys Glu Pro Val Pro Gln Pro Leu Pro Ser Asp		
	450	455	460
	Asp Thr Arg Val Glu Asn Met Asp Ile Ser Asp Glu Glu Glu Gly Gly		
15	465	470	475 480
	Ala Pro Pro Pro Gly Ser Pro Gln Val Leu Glu Glu Asp Glu Ala Glu		
	485	490	495
	Leu Glu Leu Gln Lys Gln Leu Glu Lys Gly Arg Arg Leu Arg Gln Leu		
	500	505	510
20	Gln Gln Leu Gln Gln Leu Arg Asp Ser Gly Glu Lys Val Val Glu Ile		
	515	520	525
	Val Lys Lys Leu Glu Ser Arg Gln Arg Gly Trp Glu Glu Asp Glu Asp		
	530	535	540
	Pro Glu Arg Lys Gly Ala Ile Val Phe Asn Ala Thr Ser Glu Phe Cys		
25	545	550	555 560
	Arg Thr Leu Gly Glu Ile Pro Thr Tyr Gly Leu Ala Gly Asn Arg Glu		
	565	570	575
	Glu Gln Glu Glu Leu Met Asp Phe Glu Arg Asp Glu Glu Arg Ser Ala		
	580	585	590

4/8

Asn Gly Gly Ser Glu Ser Asp Gly Glu Glu Asn Ile Gly Trp Ser Thr  
 595 600 605  
 Val Asn Leu Asp Glu Glu Lys Gln Gln Gln Asp Phe Ser Ala Ser Ser  
 610 615 620  
 5 Thr Thr Ile Leu Asp Glu Glu Pro Ile Val Asn Arg Gly Leu Ala Ala  
 625 630 635 640  
 Ala Leu Leu Leu Cys Gln Asn Lys Gly Leu Leu Glu Thr Thr Val Gln  
 645 650 655  
 Lys Val Ala Arg Val Lys Ala Pro Asn Lys Ser Leu Pro Ser Ala Val  
 10 660 665 670  
 Tyr Cys Ile Glu Asp Lys Met Ala Ile Asp Asp Lys Tyr Ser Arg Arg  
 675 680 685  
 Glu Glu Tyr Arg Gly Phe Thr Gln Asp Phe Lys Glu Lys Asp Gly Tyr  
 690 695 700  
 15 Lys Pro Asp Val Lys Ile Glu Tyr Val Asp Glu Thr Gly Arg Lys Leu  
 705 710 715 720  
 Thr Pro Lys Glu Ala Phe Arg Gln Leu Ser His Arg Phe His Gly Lys  
 725 730 735  
 Gly Ser Gly Lys Met Lys Thr Glu Arg Arg Met Lys Lys Leu Asp Glu  
 20 740 745 750  
 Glu Ala Leu Leu Lys Lys Met Ser Ser Ser Asp Thr Pro Leu Gly Thr  
 755 760 765  
 Val Ala Leu Leu Gln Glu Lys Gln Lys Ala Gln Lys Thr Pro Tyr Ile  
 770 775 780  
 25 Val Leu Ser Gly Ser Gly Lys Ser Met Asn Ala Asn Thr Ile Thr Lys  
 785 790 795 800

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2527

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

5 &lt;221&gt; 5' UTR

&lt;222&gt; (1)... (38)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

10 &lt;222&gt; (39)... (2438)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 3' UTR

&lt;222&gt; (2439)... (2506)

15

&lt;400&gt; 2

	ggttcggcgg cagccgggct cggagtggac gtgccactat ggggtcgtcc aagaagcatc	60
	gcggagagaa ggaggcggcc gggacgacgg cggcggccgg caccgggggt gccaccgagc	120
	agccgccg cg gcaccgggaa cacaaaaaac acaagcaccg gagtggcggc agtggcggta	180
20	gcggtggcga acgacggaag cggagccggg aacgtggggg cgagcgcggg agcgggcggc	240
	gcggggccga agctgaggcc cggagcagca cgcacgggcg ggagcgcagc caggcagagc	300
	cctccgagcg gcgcgtgaag cgggagaagc gcgatgacgg ctacgaggcc gctgccagct	360
	ccaaaactag ctgaggcgat gcctcctcac tcagcatcga ggagactaac aaactccggg	420
	caaagtggg gctgaaaccc ttggagggtta atgccatcaa gaaggaggcg ggcaccaagg	480
25	aggagcccgt gacagctgat gtcacaaacc ctatggcctt gcgacagcga gaggagctgc	540
	gggagaagct ggcggctgcc aaggagaagc gcctgctgaa ccaaaagctg gggaagataa	600
	agaccctagg agaggatgac ccctggctgg acgacactgc agcctggatc gagaggagcc	660
	ggcagctgca gaaggagaag gacctggcag agaagagggc caagttactg gaggagatgg	720
	accaagagtt tgggtgcagc actctggtgg aggaggagtt cgggcagagg cggcaggacc	780



	tgtacagtgc cgggacctg cagggcctca ccgtggagca tgccattgat tccttccgag	840
	aaggggagac aatgattctt accctcaagg acaaaggcgt gctgcaggag gaggaggacg	900
	tgctggtgaa cgtgaacctg gtggataagg agcgggcaga gaaaaatgtg gagctgcgga	960
	agaagaagcc tgactacctg ccctatgccg aggacgagag cgtggacgac ctggcgacgc	1020
5	aaaaaccicg ctctatcctg tccaagtatg acgaagagct tgaaggggag cggccacatt	1080
	ccttccgctt ggagcagggc ggcacggctg atggcctgcg ggagcgggag ctggaggaga	1140
	tccgggcca gctgcggctg caggctcagt ccctgagcac agtggggccc cggtggcct	1200
	ccgaatacct cacgcctgag gagatggtga cctttaaaaa gaccaagcgg aggggtgaaga	1260
	aaatccgcaa gaaggagaag gaggtagtag tgcgggcaga tgacttgctg cctctcgggg	1320
10	accagactca ggatggggac tttggttcca gactgcgggg acggggtcgc cgccgagtgt	1380
	ccgaagtgga ggaggagaag gagcctgtgc ctacagcccct gccgtcggac gacacccgag	1440
	tggagaacat ggacatcagt gatgaggagg aaggtggagc tccaccgccg ggggtccccgc	1500
	aggtgctgga ggaggacgag gcggagctgg agctgcagaa gcagctggag aagggacgcc	1560
	ggctgcgaca gttacagcag ctacagcagc tgcgagacag tggcgagaag gtggtggaga	1620
15	ttgtgaagaa gctggagtct cgccagcggg gctgggagga ggatgaggat cccgagcgga	1680
	agggggccat cgtgttcaac gccacgtccg agttctgccg caccttgggg gagatcccca	1740
	cctacgggct ggctggcaat cgcgaggagc aggaggagct catggacttt gaacgggatg	1800
	aggagcgctc agccaacggt ggctccgaat ctgacgggga ggagaacatc ggctggagca	1860
	cggtgaacct ggacgaggag aagcagcagc aggatttctc tgcttcctcc accaccatcc	1920
20	tggacgagga accgatcgtg aatagggggc tggcagctgc cctgctcctg tgcagaaca	1980
	aagggtgct ggagaccaca gtgcagaagg tggcccggt gaaggcccc aacaagtgc	2040
	tgcctcagc cgtgtactgc atcgaggata agatggccat cgatgacaag tacagccgga	2100
	gggaggaata ccgaggcttc acacaggact tcaaggagaa ggacggctac aaacccgacg	2160
	ttaagatcga atacgtggat gagacgggcc ggaaactcac acccaaggag gctttccggc	2220
25	agctgtcgca ccgcttccat ggcaagggt caggcaagat gaagacagag cggcgatga	2280
	agaagctgga cgaggaggcg ctctgaaga agatgagctc cagcgacacg cccctgggca	2340
	ccgtggccct gctccaggag aagcagaagg ctgagaagac cccctacatc gtgctcagcg	2400
	gcagcggcaa gagcatgaac gcgaacacca tcaccaagtg acagcgccct cccgtagtcg	2460
	gcctgcctc aaccttcata ttaataaag ctccctcctt atttttaaaa aaaaaaaaaa	2520

aaaaaaaa

2527

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 9

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

Glu Tyr Arg Gly Phe Thr Gln Asp Phe

5

10

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

15 &lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; 2

&lt;223&gt; Xaa is Phe, Tyr, Met or Trp.

&lt;220&gt;

20 &lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; 9

&lt;223&gt; Xaa is Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

&lt;400&gt; 4

Glu Xaa Arg Gly Phe Thr Gln Asp Xaa

25

5

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

8/8

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;400&gt; 5

5 Glu Tyr Arg Gly Phe Thr Gln Asp Ile

5

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 9

10 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;400&gt; 6

15 Glu Tyr Arg Gly Phe Thr Gln Asp Leu

5

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 9

20 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;400&gt; 7

25 Glu Tyr Arg Gly Phe Thr Gln Asp Trp

5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/05430

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C07K7/06, C12N5/08, 15/12, A61K38/08, 45/05

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C07K7/06, 14/82, C12N5/06, 5/08, 15/12-15/28, A61K38/08, 38/17

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	Cancer Research, Volume 55, issued 1 October 1995, Masanobu Nakao et al., "HLA A2601-restricted CTLs Recognize a Peptide Antigen Expressed on Squamous Cell Carcinoma", pages 4248-4252	9, 11 10, 12 1-8
Y A	Clinical Immunology, Vol. 27, No. 9, September, 1995, Yuuko Yamazaki, "Gairai Kogenous no MHC class I ni yoru teiji no kijo", p.1034-1042	10, 12 1-9, 11
PX	WO, 97/46676, A1 (Kyogo Itoh), 11 December, 1997 (11. 12. 97) & AU, 9730479, A	1-8
PX	Journal of Experimental Medicine, Volume 187, Number 3, 2 February 1998, Shigeki Shichijo et al., "A Gene Encoding Antigenic Peptides of Human Squamous Cell Carcinoma Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes", pages 277-288	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
2 March, 1999 (02. 03. 99)Date of mailing of the international search report  
16 March, 1999 (16. 03. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	February 1998, Shigeki Shichijo et al., "A Gene Encoding Antigenic Peptides of Human Squamous Cell Carcinoma Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes", pages 277-288	

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/05430

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>°</sup> C07K7/06, C12N5/08, 15/12, A61K38/08, 45/05

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>°</sup> C07K7/06, 14/82, C12N5/06, 5/08, 15/12-15/28, A61K38/08, 38/17

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) .

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	Cancer Research, Volume 55, issued 1 October 1995, Masanobu Nakao et al., "HLA A2601-restricted CTLs Recognize a Peptide Antigen Expressed on Squamous Cell Carcinoma"; pages 4248-4252	9, 11 10, 12 1-8
Y A	臨床免疫, 第27巻, 第9号, 9月. 1995, 山崎裕子, 「外来抗原のMHCクラスIによる提示の機序」, p. 1034-1042	10, 12 1-9, 11
P X	WO, 97/46676, A1 (伊東恭悟) 11. 12月. 1997 (11. 12. 97) & AU, 9730479, A	1-8
P X	Journal of Experimental Medicine, Volume 187, Number 3, 2	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02. 03. 99

国際調査報告の発送日

16.03.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内 田 俊 生

印

4 B

8 2 1 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3448